

# بررسی ارتباط بین چند شکلی ژنی (A→C) ۱۱۸۸+ ژن IL-12 با سطح سرمی سیتوکین IL-12 در بیماران مبتلا به عفونت نهفته هیپاتیت B

\*دکتر محمد کاظمی عرب آبادی (Ph D)<sup>۱</sup> - دکتر علی اکبر پور فتح اله (Ph D)<sup>۲</sup> - دکتر غلامحسین حسن شاهی (Ph D)<sup>۱</sup> -

وحید پولادوند (MS)<sup>۳</sup> - نرگس یقینی (MS)<sup>۳</sup> - دکتر علی شمسی زاده (Ph D)<sup>۲</sup>

\*نویسنده مسئول: گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، رفسنجان

پست الکترونیک: kazemi24@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۸۸/۲/۲۲ تاریخ پذیرش: ۸۸/۵/۲۶

## چکیده

مقدمه: عفونت نهفته هیپاتیت B (OBI) فرمی بالینی از هیپاتیت B است که در آن فرد به رغم منفی بودن HBsAg دارای HBV-DNA مثبت در خون محیطی است.

هدف: بررسی ارتباط چند شکلی ژنی موجود در ناحیه ۱۱۸۸+ ژن IL-12 و سطح سرمی این سیتوکین در OBI.

مواد و روش‌ها: ۳۷۰۰ نمونه پلاسما از نظر HBsAg و anti-HBc آزمایش شدند. نمونه‌های HBsAg منفی و anti-HBc مثبت از نظر وجود HBV-DNA با روش PCR بررسی شدند. نمونه‌های HBV-DNA مثبت به عنوان موارد عفونت نهفته هیپاتیت B به ترتیب با روش‌های PCR-SSP و الیزا از نظر چند شکلی ژن ناحیه ۱۱۸۸+ ژن IL-12 و میزان سرمی IL-12 بررسی شدند.

نتایج: دو گروه از نظر وجود آلل CC در ناحیه ۱۱۸۸+ تفاوت معنی‌دار آماری داشتند ولی در تمام آلل‌های دیگر تفاوتی بدست نیامد. میزان سرمی IL-12 در بیماران نسبت به گروه سالم نیز تفاوت معنی‌دار آماری نداشت و بین آلل‌های ناحیه ۱۱۸۸+ ژن IL-12 و میزان سرمی این سیتوکین نیز ارتباط معنی‌دار وجود نداشت.

نتیجه‌گیری: تولید مقادیر کافی سیتوکین IL-12 نقص در این بیماران دارد که شاید ناشی از تفاوت در ژن سیتوکین نسبت به افراد سالم باشد. چون آلل CC با OBI ارتباط معنی‌دار دارد، به نظر می‌رسد که این ناحیه از ژن IL-12 اهمیت ویژه‌ای در میزان بیان ژن این سیتوکین داشته باشد. با توجه به عدم ارتباط بین سطح سرمی این سیتوکین با آلل‌های این ناحیه، بررسی ارتباط این آلل‌ها با میزان تولید سیتوکین IL-12 در محیط In vitro می‌تواند بسیار کمک‌کننده باشد.

کلید واژه‌ها: آی ال-۱۲ / پلی مورفیسم (ژنتیک) / هیپاتیت بی

مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان، دوره هجدهم شماره ۷۲، صفحات: ۴۶-۳۹

## مقدمه

چرا پس از تماس با ویروس هیپاتیت B فرم‌های متعدد هیپاتیت B در افراد یک جامعه بوجود می‌آید، بسیاری از محققان به بررسی تفاوت‌های ژنتیکی و ایمونولوژی بیماران با فرم‌های مختلف بالینی هیپاتیت B نسبت به گروه مقاوم (clearance) می‌پردازند. یکی از این موارد که ذهن این محققان را به خود معطوف کرده، سیتوکین‌های مرتبط با ایمنی سلولی هستند زیرا معمولاً میزان سرمی این سیتوکین‌ها در عفونت‌های ویروسی برای مقابله با آنها و حتی پاکسازی کامل عامل عفونی افزایش می‌یابد (۴). IL-12 یکی از مهم‌ترین سیتوکین‌های تقویت‌کننده ایمنی سلولی در مقابله با عفونت‌های ویروسی است (۵) که از سیتوکین‌های اصلی دستگاه ایمنی در فعال‌سازی سلول‌های NK و لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک محسوب

عفونت نهفته هیپاتیت B [Occult Hepatitis B Infection (OBI)] فرمی بالینی از هیپاتیت B است که در آن فرد به رغم منفی بودن HBsAg دارای HBV-DNA در خون محیطی است (۱). این فرم هیپاتیت B مشکلات عدیده‌ای را برای سازمان انتقال خون بوجود آورده به گونه‌ای که با وجود بررسی تمام نمونه‌های اهداکنندگان از نظر HBsAg، باز مواردی از هیپاتیت B پس از تزریق خون گزارش می‌شود (۲). محققان علت این امر را به موارد متعددی از جمله OBI در اهداکنندگان خون نسبت می‌دهند (۳). ما در مطالعات قبلی به شیوع بالای این فرم از بیماری در اهداکنندگان خون اصفهان (۲) و رفسنجان پی بردیم (۳). با وجود دانش گسترده دانشمندان درباره ویروس هیپاتیت B هنوز این سوال بدون پاسخ مانده که

استخراج شود. لازم به ذکر است که گروه کنترل از نظر سن، جنس و طبقه اجتماعی (بر اساس درآمد سالانه بیش از ۹ میلیون تومان: بالا، بین ۳-۹ میلیون تومان: متوسط و زیر ۳ میلیون تومان: ضعیف) با گروه مورد بررسی همسان‌سازی شدند. چون، طبقه اجتماعی افراد ممکن است بر میزان برخورد آنها با HBV و قدرت سیستم ایمنی افراد مؤثر باشد با منطبق کردن دو گروه از این نظر به حذف این عامل مخدوش‌کننده پرداخته شد.

(۲) **تست‌های الیزا:** برای غربال کردن نمونه‌ها از نظر HBsAg از کیت‌های الیزای تجاری (Behring, Germany) طبق رهنمود شرکت سازنده، استفاده شد. نمونه‌های منفی دوباره از نظر HBsAg آزمایش شدند و از روش ساندویچ استفاده شد. سپس، نمونه‌های HBsAg منفی به روش الیزا و استفاده از کیت‌های تجاری anti-HBsAg (RADIM, Italy) برای غربال کردن نمونه‌ها از نظر anti-HBc بررسی شدند. در تست اخیر از روش رقابتی استفاده می‌شود. در ضمن تمام نمونه‌ها از نظر anti-HCV, anti-HIV و anti-HTLV-1 با کیت‌های تجاری الیزا (RADIM, Italy) بررسی شدند.

(۳) **استخراج DNA ویروسی:** برای استخراج DNA ویروس هپاتیت B ۲۰۰µl پلاسما با ۲۰۰µl پروتئیناز k (۲۰۰µg/ml) مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲°C و سپس ۵ دقیقه در ۴°C نگهداری شد. آنگاه، استخراج به روش استاندارد فنل/کلروفرم انجام شد. بعد از ته نشین کردن DNA توسط اتانول مقدار ۳۰µl آب DNase free به آن افزوده شد و در ۲۰°C - نگهداری شد (۵).

(۴) **HBV-DNA PCR:** در حجم ۲۵µl و مراحل زیر انجام شد:

10 mM tris-HCL, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> ۱٪، ۲۰۰ میکرومول از هر dNTP، ۰.۶µM از هر پرایمر، ۵µl از DNA استخراج شده به همراه آنزیم Taq DNA polymerase 5. ترتیب توالی پرایمر جلو برنده و معکوس در جدول ۱ نشان داده شده است. طی این واکنش PCR مقدار ۵۰۰ bp از ژن S از ویروس هپاتیت B تکثیر داده شد. سیکل‌های PCR به این گونه بود: یک

می‌شود (۵) به نظر محققان ایمنی‌شناسی IL-12 یکی از سیتوکین‌های کلیدی برای ایجاد تعادل بین Th1 و Th2 باشد (۶). چون بیماران OBI قادر به پاکسازی کامل ویروس از خون نیستند، به نظر می‌رسد که این افراد در ایجاد بخشی از پاسخ ایمنی در برابر این ویروس نقص داشته باشند. بنابراین، در این مطالعه به بررسی میزان سرمی سیتوکین IL-12 در بیماران دچار OBI پرداختیم. نتیجه مطالعات نشان می‌دهد که چند شکلی‌های ژنی در ژن سیتوکین‌ها می‌تواند بر میزان بیان آنها مؤثر باشد (۷). مثلاً چندشکلی‌های ژنی در ناحیه +۱۱۸۸ ژن IL-12 (A→C) در ناحیه غیرکدونی (ایترون) این ژن و ناحیه ای معروف به 3'UTR بوده و با بروز تعدادی از بیماری‌ها مرتبط است (۸و۹). ممکن است این چند شکلی‌های ژنی با تأثیر بر فرایند پردازش mRNA بر میزان بیان این ژن مؤثر باشد (۹).

بنابراین، ما در این مطالعه به بررسی ارتباط میزان سرمی IL-12 و چند شکلی ژنی در ناحیه +۱۱۸۸ ژن این سیتوکین با بیماری OBI و همچنین بررسی ارتباط این چند شکلی‌ها با میزان سرمی IL-12 در بیماران دچار OBI پرداختیم.

## مواد و روش‌ها

(۱) **جمع‌آوری نمونه:** در طی ماه‌های اسفند ۱۳۸۵ تا بهمن ۱۳۸۶ ۱۳۸۶ cc از ۳۷۰۰ نمونه FFP مراجعه‌کنندگان به سازمان انتقال خون رفسنجان که بین ۱۸ تا ۵۰ سال داشتند جمع‌آوری شد. سپس، نمونه‌ها در ۲۰°C - به مدت دو ماه نگهداری و برای نگهداری بیش از دو ماه از دمای ۷۰°C - استفاده شد. آنگاه برای بررسی نمونه‌های بیماران با عفونت نهفته هپاتیت B از نظر نوع پلی‌مرفیسم در ناحیه ۵۹۰-ژن IL-4، از تمام افراد anti-HBc و HBV-DNA مثبت (۵۷ نفر) به عنوان افراد مبتلا به OBI و افراد anti-HBc مثبت اما HBV-DNA منفی (۱۰۰ نفر) به عنوان گروه کنترل، نمونه تازه خون محیطی به همراه ضد انعقاد EDTA گرفته شد تا در مراحل بعدی از آنها DNA ژنومی

آگارز ۲٪ به همراه اتیدیوم بروماید تهیه، سپس محصول PCR به همراه 50 bp ladder الکتروفورز شد (شکل ۱). تمام مواد فوق از شرکت سیناژن تهیه شدند.

۴) الیزا برای بررسی میزان سرمی IL-12: میزان سرمی سیتوکین IL-12 با استفاده از کیت‌های تجاری (eBioscience, Esp) بر اساس راهکار شرکت سازنده اندازه‌گیری شد. حساسیت کیت ۲pg/ml بود و ایتراسی و ایتراسی در مورد این کیت انجام شد.

آزمون آماری: یافته‌ها در محیط آماری SPSS پردازش شد و پس از آزمون Hardy-Weinberg Equilibrium، آزمون آماری  $X^2$  انجام شد و سطح سرمی IL-12 و ارتباط آن با نوع چند شکلی ژنی با استفاده از روش آماری پارامتری t-test اندازه‌گیری شد.

### نتایج

نتایج بررسی چند شکلی ژنی در ناحیه +۱۱۸۸ ژن IL-12 نشان داد که ۲۰ (۳۵٪) نفر از بیماران آلل AA و ۳۶ (۳۶٪) نفر از گروه کنترل این آلل را داشتند. آزمون‌های آماری بین دو گروه در این مورد اختلاف معنی‌دار نشان نداد ( $P < 0.90$ ). همچنین، ۳۷ (۶۴/۹٪) نفر از بیماران OBI آلل AC در ناحیه +۱۱۸۸ و ۵۴ (۵۴٪) نفر از گروه کنترل آلل AC در ژن IL-12 داشتند ( $P < 0.24$ ). با وجودی که در گروه مورد هیچ موردی از آلل CC دیده نشد اما در گروه کنترل ۱۰ (۱۰٪) نفر دارای این آلل بودند و آزمون‌های آماری در مورد این آلل تفاوت معنی‌دار نشان داد ( $P < 0.033$ ). نتایج در جدول ۲ و شکل ۱ آورده شده است.

این جدول فراوانی و درصد‌های مربوط به هر یک از حالت‌های چندشکلی ژنی در ناحیه +۱۱۸۸ ژن IL-12 در هر دو گروه مورد و شاهد را نشان می‌دهد.

نتایج بررسی میزان سرمی IL-12 در بیماران دچار pg/ml OBI ۴/۴۱±۰/۶۲ و در افراد سالم ۵/۳۴±۱/۱۱ pg/ml است (شکل ۲). گرچه میزان سرمی IL-12 در بیماران از افراد

سیکل؛ ۹۳°C به مدت ۶۰ ثانیه، ۶۰°C به مدت ۲۰ ثانیه، ۷۲°C به مدت ۴۰ ثانیه و سپس ۳۵ سیکل به صورت: ۹۳°C به مدت ۲۰ ثانیه، ۶۰°C به مدت ۷۲°C به مدت ۴۰ ثانیه. یک نمونه از ژنوم HBV نیز از یک بیمار HBsAg مثبت به عنوان کنترل مثبت تهیه و استفاده شد. برای الکتروفورز ابتدا یک ژل آگارز ۱/۵٪ به همراه رنگ اتیدیوم بروماید آماده و سپس ۱۰µl از محصول PCR به همراه ۴µl از بافر رنگی همراه (برومو فنل بلو به همراه ساکارز) بر روی این ژل الکتروفورز شد. پیدایش باند ۵۰۰ نشانگر مثبت بودن نمونه بود. در ضمن برای نشان دادن اندازه باند، ۱۰۰bp ladder تولیدی شرکت سیناژن بکار رفت.

۲) استخراج DNA ژنومی: DNA ژنومی افراد از نمونه‌های خون محیطی و توسط کیت‌های استخراج DNA از شرکت Bioneer ساخت کشور انگلستان، مطابق با دستورالعمل کیت استخراج و در ویال‌های جداگانه تقسیم و در دمای ۲۰°C- تا هنگام آزمایش PCR نگهداری شد.

۳) بررسی نوع چند شکلی ژنی: ARMS-PCR برای بررسی چند شکلی ژن ناحیه +۱۱۸۸ ژن IL-12، استفاده از پرایمرهای تکثیردهنده قطعه ۱۱۶bp انجام شد و به همراه آن از پرایمرهای ژن بتاگلوبولین به عنوان کنترل داخلی که قطعه ۷۹۶bp را تکثیر می‌داد استفاده شد (جدول و شکل ۱).

PCR در حجم ۲۵µl شامل این موارد انجام شد: ۱/۵ میلی‌مولار  $MgCl_2$ ، ۱۰ میلی‌مولار tris-HCL، ۵۰ میلی‌مولار KCl، ژلاتین ۱٪، ۲۰۰ میکرومول از هر dNTP، ۰/۶ میکرومول از هر پرایمر (جدول ۱)، ۵۰۰ نانوگرم از DNA استخراج شده به همراه ۵ واحد از آنزیم Taq DNA polymerase. چرخه‌های PCR به این گونه بود: یک سیکل؛ ۹۴°C به مدت ۱ دقیقه، ۵۸،۵°C به مدت ۴۰ ثانیه، ۷۲°C به مدت ۴۰ ثانیه و سپس ۳۵ سیکل به صورت: ۹۴°C به مدت ۴۰ ثانیه، ۵۸،۵°C به مدت ۴۰ ثانیه، ۷۲°C به مدت ۴۰ ثانیه. برای الکتروفورز ابتدا یک ژل

سالم کمتر بود اما بررسی های آماری با t-test این اختلاف را معنی دار نشان نداد ( $P < 0.95$ ).

جدول ۱: توالی پرایمرها و اندازه قطعه تکثیری

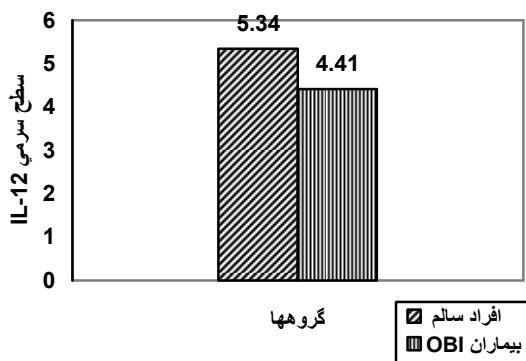
اندازه قطعه تکثیری	توالی پرایمر	نام ژن
۵۰۰bp	F: 5'-TCGTGGTGGACTTCTCTC-3' R: 5'-ACAGTGGGGGAAAGCCCAT-3'	ژن S (HBV)
۱۱۶bp	F (common): 5'-GACACAACGGAATAGACC-3' A آلل: R: 5'-AATGAGCATTTAGCATCT-3' C آلل: R: 5'-AATGAGCATTTAGCATCG-3'	IL-12
۷۹۶bp	F: 5'-TGCCAAGTGGAGCACCCAA-3' R: 5'-GCATCTTGCTCTGTGCAGAT-3'	بتا گلوبولین

جدول ۲: فراوانی و درصد های مربوط به هر یک از حالات چند شکلی ژنی موجود در ناحیه ۱۱۸۸+ ژن IL-12 در هر دو گروه مورد و شاهد

نتیجه آزمون آماری	شاهد	مورد	وضعیت چند شکلی ژنی
$P > 0.90$	۳۶ ٪۳۶	۲۰ ٪۳۵	AA n (%)
$P > 0.24$	۵۴ ٪۵۴	۳۷ ٪۶۴/۹	AC n (%)
$P < 0.033$	۱۰ ٪۱۰	۰ ٪۰	CC n (%)
	۱۰۰	۵۷	جمع n (%)

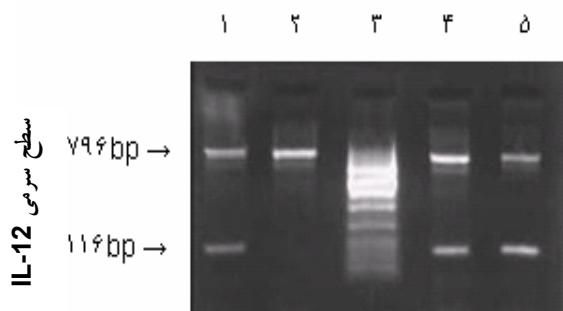
۴/۳۴±۰/۸۱ بود و آزمون آماری t این اختلاف را نیز

معنی دار نشان نداد ( $P < ۰/۹۶$ ).



شکل ۲: سطح سرمی IL-12 در بیماران مبتلا به OBI و افراد سالم

با مقایسه سطح سرمی افراد دچار OBI دارای آلل های AA و AC مشخص شد که سطح سرمی IL-12 در افراد دارای آلل AC،  $۳/۸۷ \pm ۰/۶۳$  و آلل AA،  $۵/۸ \pm ۱/۳۷$  است



شکل ۱: نمونه ای از نتایج تکثیر ژن IL-12

ستون ۱ و ۴: قطعه تکثیری حاصل از ژن IL-12 (۱۱۶bp) با حضور پرایمر برگشتی با انتهای C به همراه کنترل داخلی (۷۹۶bp)، ستون ۲ و ۵: ویال حاوی پرایمر برگشتی دارای نوکلئوتید A در انتهای ۳ (۱۱۶bp) به همراه کنترل داخلی (۷۹۶bp)، ستون ۳: 50bp ladder.

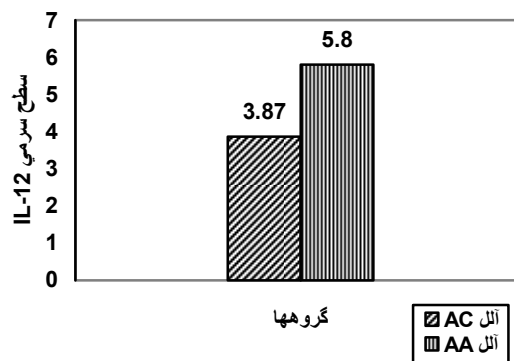
طبق نمودار میزان سرمی IL-12 بیماران دچار OBI نسبت به افراد سالم کمتر بوده اما این کاهش معنی دار نیست. میزان سرمی این سیتوکین در زنان  $۴/۸۳ \pm ۱/۰۲$  و در مردان

به نقش مهم سیتوکین‌ها در بیماری‌های ویروسی به نظر می‌رسد که این سیتوکین‌ها نقش مهمی در ریشه‌کنی HBV در بدن ایفا کنند (۱۵). مطالعات مختلف نشان داده که سلول‌های NK و لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک (دو سلول مهم ایمنی سلولی در مبارزه با عفونت‌های ویروسی) برای اعمال خود به متعادل‌بودن این سیتوکین نیاز دارند (۱۱).

همان‌گونه که در بخش نتایج ذکر شد، بین نبودن آلل CC در ناحیه ۱۱۸۸+ ژن IL-12 و OBI ارتباط معنی‌دار وجود دارد. تا جایی که ما می‌دانیم تاکنون هیچ مطالعه‌ای به بررسی ارتباط این آلل با OBI نپرداخته است. همچنین مطالعات اندک بر دیگر اشکال بالینی هپاتیت B بسیار اندک و در بیشتر موارد بر هپاتیت C صورت گرفته است. مثلاً Park و همکاران طی مطالعه خود نتوانستند هیچ‌گونه ارتباطی بین این آلل‌ها و حساسی یا مقاومت به HBV را نشان دهند (۱۶). مطالعه Nieters و همکاران نیز نتوانست رابطه معنی‌داری بین آلل‌های موجود در ناحیه ۱۱۸۸+ ژن IL-12 و ابتلای به سرطان کبد متعاقب عفونت مزمن هپاتیت B بدست آورند (۱۷). مطالعه دیگری بر بیماران آلوده به هپاتیت C نشان داد که ارتباط خوبی بین آلل AA و مزمن شدن بیماری وجود دارد (۱۸). چون، آلل AA با بیان افزایش یافته IL-12 همراه است، نتایج این تحقیق کمی عجیب و قابل پی‌گیری به نظر می‌رسد. این در حالی است که Hegazy و همکاران به ارتباط بین آلل CC این ناحیه با عفونت مزمن هپاتیت C پی برده‌اند (۸).

مطالعه ما نشان داد که میزان سرمی IL-12 در بیماران دچار OBI نسبت به گروه کنترل کاهش نسبی دارد. گرچه این کاهش معنی‌دار نیست اما با توجه به این‌که سیستم ایمنی برای حذف عفونت‌های ویروسی از بدن به مقادیر کافی و افزایش یافته این سیتوکین نیاز دارد، این کاهش نسبی نیز حائز اهمیت است. به گونه‌ای که بیماران مطالعه ما نه تنها افزایشی از سیتوکین IL-12 در سطح سرمی خود نشان ندادند، بلکه کاهش نسبی نیز از این سیتوکین داشتند. بنابراین، می‌توان این‌گونه نتیجه گرفت که شاید

(شکل ۳). آزمون‌های آماری، این اختلاف را نیز معنی‌دار نشان نداد ( $P < 0.0089$ ).



شکل ۳: سطح سرمی IL-12 در بیماران مبتلا به OBI با آلل‌های AA و AC موجود در ناحیه ۱۱۸۸+ ژن IL-12. همان‌گونه که شکل نشان می‌دهد گرچه اختلاف سطح سرمی IL-12 بین این دو گروه معنی‌دار نیست اما میزان سطح سرمی IL-12 در افراد دارای آلل AC نسبت به آلل AA با کاهش نسبی مواجه است.

### بحث و نتیجه‌گیری

سیتوکین‌ها که توسط سلول‌های ایمنی و غیرایمنی بدن تولید می‌شوند از مهم‌ترین اجزای دستگاه دفاعی بدن در برابر ویروس‌ها، هستند (۱۰). این مولکول‌ها با تأثیر بر سلول‌های ایمنی بخصوص لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک و سلول‌های کشنده طبیعی (NK) در مبارزه با آلودگی‌های ویروسی و همچنین تنظیم فعالیت این سلول‌ها به سیستم ایمنی کمک شایانی می‌کنند (۱۱). از جمله سیتوکین IL-12 در فعال شدن ایمنی سلولی نقش مهمی دارد (۱۲). در بروز عفونت‌های ویروسی الگوی تولید این مولکول‌ها تغییر کرده (۱۳) و تولید سیتوکین IL-12 به طور قابل ملاحظه افزایش می‌یابد (۱۳). OBI یکی از شکل‌های بالینی هپاتیت B است که در آن به‌رغم HBsAg منفی، HBV-DNA در خون محیطی وجود دارد (۱ و ۱۴). هنوز کاملاً مشخص نشده که چرا سیستم ایمنی این افراد قادر نیست همانند گروه پاک شونده، ویروس را به طور کامل از بدن پاک کند اما محققان، بخصوص گروه تحقیق ما در حال بررسی اجزای مختلف سیستم ایمنی این افراد در مقایسه با سیستم ایمنی افراد پاک شونده هستند. با توجه

به خوبی نوع آلل موجود را مشخص کنند. از طرفی در مطالعه ما بین آلل های AA و AC و سطح سرمی IL-12 ارتباطی بدست نیامد و با توجه به این که هیچ یک از بیماران ما دارای آلل CC نبودند، لذا بررسی ارتباط این آلل با سطح سرمی این سیتوکین در آنها مقدور نبود. با توجه به ناتوانی بیماران در تولید مقادیر کافی این سیتوکین، نویسندگان این مقاله پیشنهاد می کنند تا دیگر محققان به بررسی ارتباط این چند شکلی ژنی با سطح سرمی IL-12 به صورت *In vitro* و تحت اثر میتوژن ها بپردازند تا به مکانیسم اثر این چند شکلی های ژنی بر میزان بیان سیتوکین IL-12 در هپاتیت نهفته B و همچنین دیگر اشکال بالینی هپاتیت B پی برده شود.

در پایان باید متذکر شد که OBI بیماری پیچیده ای است و برای بررسی علت ایجاد و گسترش آن و ناتوانی در ریشه کنی ویروس باید به بررسی موارد متعددی از تفاوت های ژنتیکی و ایمونولوژی این افراد نسبت به گروه پاک شونده و ویژگی های مختلف ویروس آلوده کننده پرداخت زیرا با بررسی فقط یک جنبه نمی توان به جواب قانع کننده ای در این زمینه دست یافت و باید با بررسی تمام این جنبه ها به جمع بندی جامع و کامل دست یافت.

**تشکر و قدردانی:** نویسندگان این مقاله از ریاست و تمام کارمندان سازمان انتقال خون رفسنجان به خاطر کمک بی دریغ در انجام این پروژه و همچنین تمام بیمارانی که بدون هیچ چشم داشتی اقدام به اهدای خون برای انجام آزمایش های مربوطه همت گماردند، تقدیر و تشکر می نمایند.

یکی از دلایل اصلی که این دسته از بیماران قادر به پاکسازی کامل ویروس نیستند، ناتوانایی در تولید مقادیر کافی و لازم IL-12 باشد.

مطالعه ما اولین بررسی بر بیماران OBI است. اما مطالعات زیادی بر روی دیگر اشکال بالینی هپاتیت B صورت گرفته است. مثلاً Le و همکاران در مطالعه خود نشان دادند که سطح سرمی IL-12 در انواع اشکال بالینی هپاتیت B افزایش دارد (۱۹). به گونه ای که بیشترین افزایش در فرم برق آسای بیماری و کمترین آن مربوط به حالت بدون علامت بیماری است. مطالعه دیگری توسط Liu و همکاران نیز نشان داد که میزان سرمی IL-12 در بیماران دچار هپاتیت B حاد افزایش چشمگیری دارد (۲۰). مطالعات دیگر نیز به افزایش سطح سرمی این سیتوکین در دیگر اشکال بالینی هپاتیت B اشاره دارند (۲۱ و ۲۲).

با توجه به این که نتایج ما هیچ گونه تفاوتی در میزان سرمی IL-12 را در دو جنس زن و مرد بدست نداد، لذا می توان نتیجه گرفت که جنس بر میزان تولید این سیتوکین توسط سلول های ایمنی مؤثر نیست.

در مورد ارتباط چند شکلی های ژنی ناحیه +۱۱۸۸ ژن IL-12 و میزان این سیتوکین یافته های زیادی در دست نیست اما تنها مطالعه صورت گرفته توسط Seegers و همکاران نشان داد که چند شکلی ژنی موجود در این ناحیه که توسط آنزیم Taq-1 شناسایی می شود با بیان افزایش یافته IL-12 توسط مونوسیت ها همراه است (۹). چون این محققان از روش RFLP استفاده کرده اند نتوانستند

## منابع

1. Arababadi MK, Hassanshahi G, Yousefi H, Zarandi ER, Moradi M, Mahmoodi M. No Detected Hepatitis B Virus-DNA In Thalassemic Patients Infected By Hepatitis C Virus In Kerman Province Of Iran. *Pak J Biol Sci* 2008;11(13):1738-41.
2. Pourazar A, Salehi M, Jafarzadeh A, Arababadi MK, Oreizi F, Shariatinezhad K. Detection Of HBV DNA In Hbsag Negative Normal Blood Donors. *IJI* 2005; 2 (3): 172-176.
3. Jafarzadeh A, Arababadi MK, Mirzaee M, Pourazar A. Occult Hepatitis B Virus Infection Among Blood Donors With Antibodies To Hepatitis B Core Antigen. *Acta Med Iran* 2008; 46 (1): 27-32.
4. Collado-Hidalgo A, Bower JE, Ganz PA, Irwin MR, Cole SW. Cytokine Gene Polymorphisms And Fatigue In Breast Cancer Survivors: Early Findings. *Brain Behav Immun* 2008;8:8.

5. T akei M, Umeiyama A, Shoji N, Hashimoto T. Diterpenes Drive Th1 Polarization Depending On IL-12. *Int Immunopharmacol* 2008;8(11):1602-8.
6. Romani L. Cell Mediated Immunity To Fungi: A Reassessment. *Med Mycol* 2008;12:1-15.
7. Stanilova S, Miteva L, Prakova G. Interleukin-12B-3'UTR Polymorphism In Association With IL-1 $\gamma$ P40 And IL-12p70 Serum Levels And Silicosis Severity. *Int J Immunogenet* 2007;34(3):193-9.
8. Hegazy D, Thurairajah P, Metzner M, Houldsworth A, Shaw S, Kaminski E, Et Al. Interleukin 12B Gene Polymorphism And Apparent Resistance To Hepatitis C Virus Infection. *Clin Exp Immunol* 2008;152(3):538-41.
9. Seegers D, Zwiers A, Strober W, Pena AS, Bouma G. A Taqi Polymorphism In The 3'UTR Of The IL-12 P40 Gene Correlates With Increased IL-12 Secretion. *Genes Immun* 2002;3(7):419-23.
10. Moschen AR, Geiger S, Krehan I, Kaser A, Tilg H. Interferon-Alpha Controls IL-17 Expression In Vitro And In Vivo. *Immunobiology* 2008;213(9-10):779-87.
11. Hassanshahi G, Jafarzadeh A, Esmaeilzadeh B, Arababadi MK, Yousefi H, Dickson AJ. Assessment Of NK Cells Response To Hepatocyte Derived Chemotactic Agents. *Pak J Biol Sci* 2008;11(8):1120-5.
12. Herrera MT, Torres M, Nevels D, Perez-Redondo CN, Ellner JJ, Sada E, Et Al. Compartmentalized Bronchoalveolar IFN-Gamma And IL-12 Response In Human Pulmonary Tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* 2008;8:8.
13. Xiong SQ, Lin BL, Gao X, Tang H, Wu CY. IL-12 Promotes HBV-Specific Central Memory CD8+ T Cell Responses By Pbmcs From Chronic Hepatitis B Virus Carriers. *Int Immunopharmacol* 2007; 7(5):578-87.
14. Arababadi MK, Pourfathollah AA, Jafarzadeh A, Hassanshahi G, Daneshmandi S, Zarandi ER, Shamsyadeh A, Moghadam S. Evaluation Of Relation Between Polymorphisms In -590 Region Of IL-4 And Occult HBV Infection. *Journal Of Gilan University Of Medical Sciences*, 2009; 8(70): 1-8.
15. Lohr HF, Pingel S, Bocher WO, Bernhard H, Herzog-Hauff S, Rose-John S, Et Al. Reduced Virus Specific T Helper Cell Induction By Autologous Dendritic Cells In Patients With Chronic Hepatitis B - Restoration By Exogenous Interleukin-12. *Clin Exp Immunol* 2002;130(1):107-14.
16. Park JS, Cheong JY, Kang JK, Cho JH, Yu S, Shin HD, Et Al. [Association Of Interleukin-12 Gene Polymorphism With Persistence Of Hepatitis B Virus Infection And Hepatocellular Carcinoma]. *Korean J Gastroenterol* 2007;50(5):313-8.
17. Nieters A, Yuan JM, Sun CL, Zhang ZQ, Stoehlmacher J, Govindarajan S, Et Al. Effect Of Cytokine Genotypes On The Hepatitis B Virus-Hepatocellular Carcinoma Association. *Cancer* 2005;103(4):740-8.
18. Yin LM, Zhu WF, Wei L, Xu XY, Sun DG, Wang YB, Et Al. Association Of Interleukin-12 P40 Gene 3'-Untranslated Region Polymorphism And Outcome Of HCV Infection. *World J Gastroenterol* 2004; 10(16):2330-3.
19. Song Le H, Binh VQ, Duy DN, Kun JF, Bock TC, Kreamsner PG, Et Al. Serum Cytokine Profiles Associated with Clinical Presentation In Vietnamese Infected With Hepatitis B Virus. *J Clin Virol* 2003; 28(1):93-103.
20. Liu Q, Feng GX, Lin YL, Peng YZ, Mo BQ. Detection of Interleukin-6 and -12 in of Hepatitis B Patients and Its Clinical Significance. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 2001; 21(11): 858-59[Text in Persian].
21. Ayada M, Ishikawa T, Okumura A, Tanabe J, Ito H, Ohashi T, Et Al. Alteration of Serum Cytokine Balances Among Different Phases of Chronic Hepatitis B Virus Infection. *Hepatol Res* 2006; 34(4):214-21.
22. Gora-Gebka M, Liberek A, Szydłowska-Lysiak W, Bako W, Korzon M. Serum Interleukin 6 and Interleukin 12 Levels in Children With Chronic Hepatitis HBV Treated With Interferon Alpha. *Ann Hepatol* 2003; 2(2):92-7.

# Evaluation the Relationship between Alleles of +1188 in Region of IL-12 with Serum Level of Cytokine in Patients with Occult HBV Infection

\* Kazemi Arababadi M.(Ph D)<sup>1</sup>-Pourfathollah A.A(Ph D)<sup>2</sup>- Hassanshahi Gh. H.(Ph D)<sup>1</sup> – Pooladvand V.(MS)<sup>3</sup>-  
Yaghini N.(MS)<sup>3</sup>- Shamsyzadeh A.(Ph D)<sup>4</sup>

\*Corresponding Address: Department of Microbiology- Immunology- Hematology- Faculty of Medicine  
Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran

E-mail: kazemi24@yahoo.com

Received: 12/May/2009 Accepted: 17/Aug/2009

## Abstract

**Introduction:** Occult hepatitis B infection (OBI) is a form of hepatitis, which in despite of absence of detectable HBsAg, HBV-DNA is present in peripheral blood of patients.

**Objective:** Evaluation the relationship between alleles of +1188 in region of IL-12 with serum level of cytokine in patients with occult HBV infection

**Materials and Methods:** In this study, the plasma samples of 3700 blood donors were tested for HBsAg and anti-HBc by ELISA. The HBsAg negative ve and anti-HBc positive samples were selected and screened for HBV-DNA by PCR. HBV-DNA positive samples assigned as OBI cases and PCR-SSP and ELISA were performed to examine the polymorphisms in region of (+1188 and serum level of IL-12) respectively.

**Results:** The results showed that there is a significant difference in CC allele of +1188 region of IL-12 in two groups and no difference in the other evaluated genes. There is not any significant difference in serum level of IL-12 between OBI patients and controls. Our results also showed that there isn't any significant statistically relation between alleles of +1188 region of IL-12 with serum level of cytokine.

**Conclusion:** According to the results of this study it could be concluded that OBI patients unable to produce enough quantity of IL-12 and it may be related to different IL-12 gene. CC allele was associated with OBI, hence, it seems that +1188 region of IL-12 gene has an important role in expression of IL-12 gene. Evaluation of relation between polymorphisms in +1188 region of IL-12 gene and its expression. In vitro and under mitogene affect can useful because no association was seen between serum level of IL-12 and alleles of this region.

**Key words:** Hepatitis B/ IL-12/ Polymorphism(Genetics)

Journal of Guilan University of Medical Sciences, No: 72, Pages:39-46

1. Department of Microbiology- Immunology- Hematology, Faculty of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, IRAN 2. Department of Immunology, Faculty of Medicine, Tarbiat Modarres University, Tehran. IRAN 3. Department of Biochemistry, Biophysics and Genetic, Faculty of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, IRAN 4. Department of Physiology, Faculty of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, IRAN